

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-274964

(43)Date of publication of application : 30.09.2003

(51)Int.Cl.	C12N 15/09
	C12N 1/15
	C12N 1/19
	C12N 1/21
	C12N 5/10
	C12N 9/04
	C12Q 1/68

(21)Application number : 2002-082254

(71)Applicant : HAYADE KOJI

(22)Date of filing : 25.03.2002

(72)Inventor : HAYADE KOJI

(54) NEW GLUCOSE DEHYDROGENASE AND GENE ENCODING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new glucose dehydrogenase and a gene encoding the dehydrogenase and to provide a method for using the dehydrogenase.

SOLUTION: The glucose dehydrogenase is produced by culturing a transformant transduced with an • subunit gene of glucose dehydrogenase isolated from Burkholderia cepacia JCM2800 strain, JCM2801 strain or their strain in a medium and collecting the glucose dehydrogenase from the medium and/or the cell body of the bacterium or the transformant.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-274964

(P2003-274964A)

(43) 公開日 平成15年9月30日 (2003.9.30)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
1/15		1/19	4 B 0 5 0
1/19		1/21	4 B 0 6 3
1/21		9/04	D 4 B 0 6 5
5/10		C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 16 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-82254(P2002-82254)

(22) 出願日 平成14年3月25日 (2002.3.25)

(71) 出願人 596153357

早出 広司

東京都目黒区南1-13-16

(72) 発明者 早出 広司

東京都目黒区南1-13-16

(74) 代理人 100086667

弁理士 小林 孝次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規グルコース脱水素酵素及びそれをコードする遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 新規なグルコース脱水素酵素及びそれをコードする遺伝子、並びにそれらの利用法を提供する。

【解決手段】 ブルクホルデリア・セバシア JCM2800株又はJCM2801株、又はこれらの菌株から単離したグルコース脱水素酵素 α サブユニット遺伝子を導入した形質転換体を培地に培養し、同培地又は/及び前記微生物もしくは形質転換体の菌体からグルコース脱水素酵素を採取することにより、グルコース脱水素酵素を製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ブルクホルデリア・セバシア JCM2800株又はJCM2801株を培地に培養し、同培地又は／及び前記微生物菌体からグルコース脱水素酵素を採取することを特徴とするグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項2】 ブルクホルデリア・セバシア JCM2800株又はJCM2801株によって産生され得るグルコース脱水素酵素。

【請求項3】 以下の(A)または(B)に示すタンパク質。

(A) 配列番号2又は4のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号2又は4のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【請求項4】 以下の(A)又は(B)のタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号2又は4のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号2又は4のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【請求項5】 以下の(a)又は(b)に示すDNAである請求項4記載のDNA。

(a) 配列番号1又は3に記載の塩基配列を有するDNA。

(b) 配列番号1又は3に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項6】 請求項4又は5に記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項7】 請求項4又は5に記載のDNA又は請求項6記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項8】 請求項7記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項9】 配列番号1又は2の塩基配列の一部又は全部を含むポリヌクレオチドをプローブとして、微生物の染色体DNAのハイブリダイゼーションを行い、前記ポリヌクレオチドと相同性を有する配列の有無を検出することを特徴とする、グルコース脱水素酵素を保持する微生物のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規なグルコース

脱水素酵素、同酵素をコードするDNA、同酵素をコードするDNAを含有する組換えベクター、同組換えベクターで形質転換された形質転換体、及び前記形質転換体又は非形質転換微生物を用いたグルコース脱水素酵素の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 特定の基質に対して特異的に反応する酵素を用いたバイオセンサの開発は、産業の分野を問わず盛んに行われている。その中でも特にバイオセンサの1つであるグルコースセンサは、主に医療分野で測定方法やその方法を利用した装置の開発が盛んに行われている。例えばグルコースセンサは、1962年にClarkとLyonsによってグルコースオキシダーゼと酸素電極を組み合わせたバイオセンサーの報告(L. c. Clark, J. and Lyons, C. 'Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery.' Ann. n. y. Acad. Sci. 105:20-45)が最初にされて以来、約40年ほどの歴史を有している。

【0003】 このように、グルコースセンサに、酵素としてグルコースオキシダーゼが採用されてからの歴史は長い。なぜならグルコースオキシダーゼは、グルコースに対する基質特異性が高く、熱安定性に優れており、更に酵素の量産化が可能であり、生産コストが他の酵素と比べて安価である、からである。基質特異性が高いということは、酵素がグルコース以外の糖とは反応しないため、測定値に誤差を生じることなく、正確な測定が行なえるという利点に通じる。また、熱安定性に優れているということは、酵素が熱により変性し酵素活性が失活するという問題を防止することができ、長期間正確な測定が行えるという利点に通じる。

【0004】 しかし、グルコースオキシダーゼは、上記の様なメリットを有している反面、例えば溶存酸素の影響を受け、測定結果に影響があるという問題も有している。一方、グルコースオキシダーゼ以外には、グルコース脱水素酵素(以下、「グルコースデヒドロゲナーゼ」又は「GDH」ともいう)を利用したグルコースセンサの開発も行われてきた。そして、酵素も、微生物から発見されている。例えば、バチルス(Bacillus)属由来のグルコースデヒドロゲナーゼ(EC1. 1. 1. 47)及びクリプトコッカス(Cryptococcus)属由来グルコースデヒドロゲナーゼ(EC1. 1. 1. 119)が知られている。前者のグルコースデヒドロゲナーゼ(EC1. 1. 1. 47)は、 β -D-グルコース+NAD(P)⁺→D- δ -グルコノラクトン+NAD(P)H+H⁺の反応を触媒する酵素であり、後者のグルコースデヒドロゲナーゼ(EC1. 1. 1. 119)は、D-グルコース+NADP⁺→D- δ -グルコノラクトン+NADPH+H⁺の反応を触媒する酵素であり、前述した微生物由来のグルコースデヒドロゲナーゼは、既に市販もされている。これらグルコースデヒドロゲナーゼは、測定サンプルの溶存酸素の影響を受けないという利点を有する。このこと

は、酸素分圧が低い環境下で測定を行ったり、酸素量が多く要求される高濃度サンプルを測定する場合であっても、測定結果に誤差を及ぼさずに正確に測定することができるという利点に通じる。

【0005】しかし、従来に見られるグルコースデヒドロゲナーゼは、溶存酸素の影響を受けない一方、熱安定性が悪く、基質特異性がグルコースオキシダーゼよりも劣るという問題点を有しており、センサに採用される酵素として、グルコースオキシダーゼやグルコースデヒドロゲナーゼの両欠点を補う酵素の提供が望まれていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は、熱安定性に優れ、安価に生産でき、測定サンプルの溶存酸素の影響を受けないグルコースデヒドロゲナーゼが、ブルクホルデリア属の微生物（ブルクホルデリア・セバシア KS1株）によって生産されていることを見出している（特願2000-332085号、特願2000-357102号、特願2001-2786832号、PCT/JPO1/09556）。

【0007】本発明は、ブルクホルデリア・セバシア KS1株以外のブルクホルデリア細菌に由来する新規なGDH及びそれをコードする遺伝子、並びにそれらの利用法を提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、ブルクホルデリア・セバシア KS1株以外のブルクホルデリア細菌株から、GDHをコードする遺伝子を取得することに成功し、本発明に至った。

【0009】すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) ブルクホルデリア・セバシア JCM2800株又はJCM2801株を培地に培養し、同培地又は／及び前記微生物菌体からグルコース脱水素酵素を採取することを特徴とするグルコース脱水素酵素の製造方法。

(2) ブルクホルデリア・セバシア JCM2800株又はJCM2801株によって産生され得るグルコース脱水素酵素。

(3) 以下の(A)または(B)に示すタンパク質。

(A) 配列番号2又は4のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号2又は4のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

(4) 以下の(A)又は(B)のタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号2又は4のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号2又は4のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、グルコース脱水素酵素

活性を有するタンパク質。

(5) 以下の(a)又は(b)に示すDNAである(4)に記載のDNA。

(a) 配列番号1又は3に記載の塩基配列を有するDNA。

(b) 配列番号1又は3に記載の塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、グルコース脱水素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(6) (4)又は(5)に記載のDNAを含有する組換えベクター。

(7) (4)又は(5)に記載のDNA又は(6)の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

(8) (7)に記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素の製造方法。

(9) 配列番号1又は2の塩基配列の一部又は全部を含むポリヌクレオチドをプローブとして、微生物の染色体DNAのハイブリダイゼーションを行い、前記ポリヌクレオチドと相同性を有する配列の有無を検出することを特徴とする、グルコース脱水素酵素を保持する微生物のスクリーニング方法。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明者らは、理化学研究所微生物系統保存施設(Japan Collection of Microorganisms, JCM)に保存されているブルクホルデリア・セバシアJCM2800株およびJCM2801株から、GDH遺伝子を検索し、単離した。これらの菌株は、同保存施設から入手することができる。

【0011】<1>本発明のグルコース脱水素酵素
本発明のGDHは、ブルクホルデリア・セバシアJCM2800株又はJCM2801株を培地に培養し、同培地又は／及び前記微生物菌体からGDHを採取することにより、製造することができる。前記培地としては、適当な栄養培地、例えば適当な炭素源、窒素源、無機塩類、グルコース或はこれらを含む物質などを含む培地が挙げられる。炭素源としては、資化できるものはいずれの物質も利用でき、例えば、D-グルコース、L-アラビソース、D-キシロース、D-マンノース、デンプン、各種ペプトン類などが挙げられる。窒素源としては、酵母エキス、麦芽エキス、各種ペプトン類、各種肉エキス類、コーンステイプリカー、アミノ酸溶液、アンモニウム塩など有機、無機の窒素化合物又はこれらを含む物質が利用できる。無機塩としては、各種リン酸塩、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、カルシウムなどの塩類が使用される。また必要に応じて菌の生育或は酵素生産に必要な各種の無機物や有機物、例えばシリコン油、ゴマ油、各種界面活性剤などの消泡剤やビタミン類を培地に添加することができる。

【0012】培養の形態は、液体培養でも固体培養でもよいが、通常は液体培養が好適である。こうして得られ

た培養物の培地中又は／及び菌体中から本発明酵素を得ることが出来る。菌体中にある酵素は、菌体を破碎あるいは溶解することによって、菌体抽出液として得られる。

【0013】培養生成物中あるいは菌体抽出液中のGDHは、イオン交換体、ゲル濾過担体、ハイドロフォービック（疎水性）担体などを用いたクロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって精製することができる。

【0014】本酵素の活性は、公知のGDHの活性測定と同様の方法で測定することができる。具体的には、例えば次のようにして測定することができる。594 μ Mの1-メトキシフェナジメトサルフェート (mPMS) および5.94 μ Mの2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) を含む10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に、酵素試料および基質としてグルコースを基質として加え、37℃でインキュベートする。分光光度計を用いてDCIPの600nmにおける吸光度変化を追跡し、当該吸光度の減少速度を酵素反応速度とする。

【0015】尚、本発明者らは、ブルクホルデリア・セバシア KS1株が産生するGDHは、 α サブユニット、 β サブユニット、及び γ サブユニットを含む多量体タンパク質であることを確認している。これらのサブユニットのうち、 α サブユニットは単独でもGDH活性を示す。

【0016】ブルクホルデリア・セバシア KS1株が産生するGDHは、以下の理化学的性質を示す。

- ①作用：グルコースの脱水素反応を触媒する。
- ②還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60kDaと分子量約43kDaを示すサブユニットからなる。
- ③TSK gel G3000SW（東ソー（株）製）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、分子量約380kDaを示す。
- ④至適反応温度：45℃付近（Tris-HCl緩衝液、pH8.0）。

【0017】また、 α サブユニット単独では、以下の理化学的性質を示す。

- ①'グルコース脱水素酵素活性を有する。
- ②'還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60kDaを示す。
- ③'至適反応温度：75℃付近（Tris-HCl緩衝液、pH8.0）。

【0018】後述するように、ブルクホルデリア・セバシア JCM2800株又はJCM2801株から、KS1株のGDH α サブユニットをコードする遺伝子と相溶性の高い遺伝子が単離された。したがって、JCM2800株又はJCM2801株は、KS1株と類似した性質のGDHを産生すること、同GDHはKS1株の産生するGDHと同様に、多量体構造をとること、及び、 α サブユニット単独でGDH活性を示すことが強く示唆される。

【0019】JCM2800株及びJCM2801株の産生するGDH α

サブユニットは、各々配列番号2及び4に示すアミノ酸配列を有する。尚、これらのサブユニットは、GDH活性を有する限り、配列番号2又は4のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。尚、配列番号2及び4には、配列番号1及び3の塩基配列によってコードされ得るアミノ酸配列を示している可能性がある。本発明において「1又は複数」とは、1～10個、好ましくは1～5個、特に好ましくは1～3個である。

【0020】上記本発明のGDH α サブユニットは、例えば、後述する本発明のDNAによってコードされる。

【0021】<2>本発明のDNA

本発明のDNAは、例えばブルクホルデリア・セバシア JCM2800株又はJCM2801株から取得することができる。本発明のDNAは、本発明を完成する過程においては、ブルクホルデリア・セバシア JCM2800株又はJCM2801株の染色体DNAから単離された。本発明のDNAは、例えば、配列番号1及び2に示す塩基配列を有するプライマーを用い、ブルクホルデリア・セバシア、例えばJCM2800株又はJCM2801株の染色体DNAを鋳型とするPCRによって、取得することができる。また、本発明によりその塩基配列及び同塩基配列によってコードされるアミノ酸配列が明らかとなったので、これらの配列に基づいて化学合成することによっても取得することができる。また、前記配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブ又はプライマーとするハイブリダイゼーション又はPCRによって、ブルクホルデリア・セバシア JCM2800株又はJCM2801株の染色体DNAから取得することもできる。本発明のDNAは、配列番号2又は4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものの他、配列番号2又は4のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、GDH活性を有するタンパク質をコードするものであってもよい。

【0022】本発明のDNAとしては、具体的には、配列番号1又は3の塩基配列を含むDNAが挙げられる。また本発明のDNAは、配列番号1又は3の塩基配列又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、GDH活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。ストリンジェントな条件としては、70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上の相溶性を有するDNA同士がハイブリダイズする条件、具体的には、1 \times SSC、0.1%SDS、60℃が挙げられる。

【0023】本発明のDNA又は同DNAを含む組換えベクターを保持する形質転換体を培養して、同DNAの発現産物としてGDHを産生させ、これを菌体又は培養液から採取することにより、GDHを製造することができ

る。その際、本発明のDNAは、 α サブユニットをコードするDNAであってもよいが、さらに γ サブユニットを α サブユニットとともに発現させることによって、発現効率を高めることができる。 γ サブユニット及び α サブユニットを連続してコードするDNA断片は、配列番号7及び8に示す塩基配列を有するプライマーを用いたPCRによって、取得することができる。

【0024】GDHを産生させる微生物としては、大腸菌をはじめとする腸内細菌群、シュドモナス属やグルコノバクター属などのグラム陰性細菌、バチルス・サブチリス等のバチルス属細菌をはじめとするグラム陽性細菌、サッカロマイセス・セレビシエ等の酵母、アスペルギルス・ニガー等の糸状菌が挙げられるが、これらに限られず、異種タンパク質生産に適した宿主微生物であれば用いることができる。

【0025】一度選択されたGDH遺伝子を保有する組換えベクターより、微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、GDH遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法によりGDH遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによる微生物の形質転換は、例えばエシェリヒア属細菌ではカルシウム処理によるコンピテントセル法、バチルス属細菌ではプロトプラスト法、酵母ではKU法やKUR法、糸状菌ではマイクロマニピレーション法等の方法によって行うことができる。また、エレクトロポレーション法も広く用いることができる。

【0026】宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカーとGDH活性を同時に発現する微生物を検索すればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつGDHを生成する微生物を選択すればよい。形質転換体の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ビルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【0027】培養温度は菌が生育し、GDHを生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、GDHが最高

収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を完了すればよく、通常は12～72時間程度である。培地のpHは菌が発育し、GDHを生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0～9.0程度の範囲である。

【0028】培養物中のGDHを生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、GDHが培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、GDH含有溶液と微生物菌体と分離した後に利用される。GDHが菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、また、必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加してGDHを可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0029】上記のようにして得られたGDH含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって精製を行うことにより、精製されたGDHを得ることができる。

【0030】カラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該精製酵素標品は、電気泳動(SDS-PAGE)的に単一バンドを示す程度に純化されていることが好ましいが、 γ サブユニットが含まれていても良い。上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉末化して流通させることが可能である。また、後記実施例に示す α サブユニットのアミノ酸配列と同様にして β サブユニットのアミノ酸配列を決定し、 β サブユニットをコードするDNAを単離することができる。また、得られたDNAを用いて、 β サブユニットを製造することができる。さらに、 α サブユニットをコードするDNA及び β サブユニットをコードするDNAを用いて、多量体酵素を製造することもできる。

【0031】本発明のGDH又はそれを保持する形質転換体又は非形質転換微生物(ブルクホルデリア・セバシアJCM2800株又はJCM2801株)は、グルコースセンサの酵素電極として用いることができる。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明のGDHを固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固

定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明のグルコース脱水素酵素をカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。

【0032】グルコースの濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、メディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の酵素を固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコースの濃度を計算することができる。

【0033】また、本発明のGDHは、グルコース等の糖類アッセイキットの構成要素とすることができる。典型的には、キットは、本発明のGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作成のためのグルコースなどの標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う酵素は種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。

【0034】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

【0035】

【参考例1】ブルクホルデリア・セバシアKS1株を、培養液1L中に以下の成分を含む培地7Lで、34℃、8時間、培養した。

【0036】

ポリペプトン	10g
酵母抽出液	1g
NaCl	5g
KH ₂ PO ₄	2g
グルコース	5g
Einol (ABLE Co. 東京 日本)	0.14g
Total、蒸留水	1L
pH調整	7.2

【0037】本培養液7Lを4℃、10分間、9,000×gで遠心分離し、約60gの菌体を得た。60gの菌体を10mMのリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)に分散し、フレンチプレス(大竹製作所 東京 日本)で1,500Kg/cm²の圧力差を加えて、菌体膜を破壊した。細胞抽出液を8,000×gで10分間、遠心分離し、細胞固形物を除いた。さらに、その上清を、4℃で69,800×gで90分間、超遠心し、沈殿物としての膜フラクション、約8gを得た。

【0038】膜フラクションを、最終濃度でTriton-X100が1%になるように、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)で再分散した。そして、4℃、一晚、ゆっくり攪拌した。超遠心後(4℃、69,800g、90分間)、可溶性膜フラクションを、4℃で、15000×gで15分間、再遠心し、上清を得た。

【0039】その可溶性膜フラクションに、同量の0.2%Triton-X100を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)を加えた。透析後、その溶液を、0.2%Triton-X100を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)で等量化されたDEAE-TOYOPEARLカラム(22mmID×20cm 東ソー 東京 日本)に供給した。タンパク質を、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)中のNaClの濃度が0~0.15Mになるように、直線的グラジエントで溶出した。その流速は5ml/minで行った。GDHは約75mMのNaCl濃度で溶出された。GDH活性をもつフラクションを集め、0.2%Triton-X100を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0 4℃)で一晩、透析した。

【0040】さらに透析調整酵素液を、DEAE-5PWカラム(8.0mmID×7.5cm 東ソー、東京、日本)に通した。そのカラムは予め、0.2%Triton-X100を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)で平衡化されている。タンパク質を、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)中のNaClの濃度が0~100mMになるように、直線的グラジエントで溶出した。その流速は1ml/minで行った。GDH活性のあるフラクションが約20mMのNaCl濃度で溶出した。GDH活性をもつフラクションを集め、0.2%Triton-X100を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)で、一夜、脱塩し、精製酵素を得た。GDHの活性測定は、以下の方法に従い行った。電子受容体として、2,6-ジクロルフェノールインドフェノール(DCIP)及びフェナジメトサルフェート(PMS)を用いた。反応はポリエチレンチューブ内で所定の温度で実施した。0.75mM PMSと0.75mM DCIP含有25mMトリスHCl緩衝液pH8.0 20μlに酵素溶液5μlを添加した。この混合液を1分間事前定温放置した。2Mグルコース1μl(最終濃度:77mM)の添加により反応を開始させ、2分間定温放置した。次に氷冷蒸留水100μlまたは7.5M尿素120μlを添加して試料を冷却した。超微量計測用セル(100μl)及びこれを用いて計測できる分光光度計(UV160、島津製作所、京都、日本)を用いて、グルコースの脱水素化に基づく、電子受容体の還元反応を追跡した。すなわちDCIP還元にもとづく退色を、DCIPの吸収波長である600nmを時間とともに計測した。DCIPのモル吸光係数(22,23mM×cm⁻¹)を用いた。酵素1単位(U)は標準検定条件下で1分ごとに1μMグルコースを酸化する量と定義した。タンパク濃度はローリー法で測定した。

【0041】上記精製酵素について、酵素学的性質を調

べた結果を以下に示す。

- ①作用：グルコースの脱水素反応を触媒する。
 ②還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60kDaと分子量約43kDaを示すサブユニットからなる。
 ③TSK gel G3000SW（東ソー（株）製）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、分子量約380kDaを示す。
 ④至適反応温度：45℃付近（Tris-HCl緩衝液、pH8.0）。尚、75℃付近にも活性ピークを有する。

【0042】また、上記生成酵素を70℃で30分間、熱処理することによって、分子量60kDaの単一ポリペプチド（αサブユニット）が得られる。このポリペプチドについて、酵素学的性質を調べた結果を以下に示す。

- ①'グルコース脱水素酵素活性を有する。
 ②'還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60kDaを示す。
 ③'至適反応温度：75℃付近（Tris-HCl緩衝液、pH8.0）。

【0043】

【実施例1】ブルクホルデリア・セバシア JCM2800株又はJCM2801株からのGDH遺伝子の単離

（1）ブルクホルデリア・セバシアJCM2800株及びJCM2801株からの染色体DNAの調製
 ブルクホルデリア・セバシアJCM2800株及びJCM2801株より染色体遺伝子を常法に従って調製した。すなわち、これらの菌株をTL液体培地（ポリペプトン 10g、酵母抽出液 1g、NaCl 5g、KH₂PO₄ 2g、グルコース 5g；1L、pH 7.2）を用いて、34℃で一晩振盪した。増殖した菌体を遠心分離機により回収した。これらの菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl（pH8.0）、1mM EDTA、0.5% SDS、100μg/mlのプロテイナーゼKを含む溶液に懸濁し、50℃で6時間処理した。ここに等量のフェノール-クロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離機により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重層して中間層に染色体DNAを析出させた。これをガラス棒を用いてすくいとり、70%エタノールで洗浄した後、適当量のTEバッファーに溶解させ、染色体DNA溶液とした。

【0044】（2）PCRによるGDH遺伝子の増幅
 ブルクホルデリア・セバシアKS1株のGDHを構成するαサブユニットの遺伝子の塩基配列に基づいて、コード領域の前後20塩基からなる以下の塩基配列を有する1組のヌクレオチドプライマーを用いて、（1）で得た染色体DNAを鋳型とするPCR反応により増幅を行った。

【0045】（フォワード）

5'-ATGGCCGATACCGATACGCA-3'（配列番号5）
 （リバーズ）

5'-TCAGACTTCCTTCTTCAGCG-3'（配列番号6）

【0046】PCR反応により増幅された塩基配列を常法により解析したところ、ブルクホルデリア・セバシアJCM2800株由来の増幅断片は、配列番号1に示される塩基配列を有し、ブルクホルデリア・セバシアJCM2801株由来の増幅断片から、配列番号3に示される塩基配列を有することが、それぞれ確認された。

【0047】配列番号1及び3の塩基配列によってコードされ得るアミノ酸配列を、配列番号2及び4に示す。

【0048】ブルクホルデリア・セバシアKS1株、JCM2800株、JCM2801株のGDHを構成するαサブユニットの相同性を比較したところ、表1に示す結果が得られた。

【0049】

【表1】

表1 相同性比較結果（%）

比較した株	塩基配列	アミノ酸配列
KS1: JCM2800	93.7%	95.4%
KS1: JCM2801	93.3%	93.7%
JCM2801: JCM2800	97.1%	98.1%

【0050】この結果から、ブルクホルデリア属が生産するGDHと類似の酵素をスクリーニングする際に、配列番号1または配列番号2に示される塩基配列のうち、任意の長さでポリヌクレオチドプローブを作製し、これを用いて染色体DNAをスクリーニングすることが可能であることが判明した。

【0051】（3）GDHの製造

ブルクホルデリア・セバシアKS1株の生産するGDHは、GDH活性を示すαサブユニットのコード領域の上流に、αサブユニットの生産に関係するγサブユニットの存在が明らかになったことから（PCT/JPO1/09556）、γサブユニットの塩基配列を上流域に持ち、JCM2800株またはJCM2801株のαサブユニットの構造遺伝子が連続するポリシストロン構造の遺伝子を含む組換えベクターを作製し、同ベクターを導入した形質転換体を構築した。

【0052】先ずベクターに挿入する遺伝子を以下のよう調製した。γサブユニットの構造遺伝子と、JCM2800株またはJCM2801株のGDHの構造遺伝子が連続するゲノム断片を、JCM2800株またはJCM2801株のゲノムDNAをテンプレートとして、所望の制限酵素部位を含むように、PCR反応により増幅した。PCR反応には次の1組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

【0053】（フォワード）

5'-CATGCCATGGCACAACGACAACACT-3'（配列番号7）
 （リバーズ）

5'-CCCAAGCTTCAGACTTCCTTCTTCAGCG-3'（配列番号8）

【0054】このPCRにより増幅された遺伝子の5'末端

をNcoI、3'末端をHindIIIで消化した後、ベクターpTrc99A (Pharmacia社) のクローニング部位である、NcoI/HindIII部位に挿入した。得られたプラスミドをpTrc99A/ γ +JCM2800またはpTrc99A/ γ +JCM2801と命名した。

【0055】前記プラスミドにより、エシェリヒア・コリDH5 α MCR株を形質転換し、アンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取し、それを更に前述した方法により培養を行って、培養生成物のGDH活性を測定したところ、GDH活性が確認することが

できた。

【0056】

【発明の効果】本発明により、ブルクホルデリア・セバシアJCM2800株またはJCM2801株から、GDH及びそれをコードするDNAが提供される。同DNAを導入した組換え体を用いて、GDHを工業的に量産することが可能となった。

【0057】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SODE, Koji

<120> 新規グルコース脱水素酵素及びそれをコードする遺伝子

<130> P-9793

<140>

<141> 2002-03-25

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0058】

<210> 1

<211> 1620

<212> DNA

<213> ABC

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1620)

<400> 1

```

atg gcc gat acc gat acg caa aag gcc gac gtc gtc gtc gtc ggc tgc   48
Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
      1              5              10              15
ggc gtc gca ggc gcg atc gtc gca cac cag ctc gcg atg gcg ggc aag   96
Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
      20              25              30
tcc gtg atc ctg ctg gaa gcc ggc ccg cgc atg ccg cgc tgg gaa atc   144
Ser Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
      35              40              45
gtc gag cgc ttc cgc aac cag gtc gac aag acc gat ttc atg gcg ccg   192
Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Val Asp Lys Thr Asp Phe Met Ala Pro
      50              55              60
tat ccg tcg agc gca tgg gcg ccg cat ccg gaa tac ggc ccg ccg aac   240
Tyr Pro Ser Ser Ala Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
      65              70              75              80
gac tac ctg atc ctg aag ggc gag cac aag ttc aac tcg cag tac atc   288
Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
      85              90              95
cgc gcg gtg ggc ggc acg acg tgg cac tgg gcc gcg tcg gcg tgg cgc   336
Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
      100             105             110
ttc atc ccg aac gac ttc aag atg aag acc gtg tac ggt gtc ggc cgc   384

```

Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Thr Val Tyr Gly Val Gly Arg	
115 120 125	
gac tgg ccg atc cag tac gac gac atc gag cat tac tac cag cgc gcc	432
Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Ile Glu His Tyr Tyr Gln Arg Ala	
130 135 140	
gag gaa gag ctc ggc gtg tgg ggc ccg ggc ccc gag gaa gac ctg tac	480
Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr	
145 150 155 160	
tcg ccg cgc aag gag ccg tac ccg atg ccg ccg ctg ccg ttg tgc ttc	528
Ser Pro Arg Lys Glu Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe	
165 170 175	
aac gag cag acg atc aag agc ggc ctc aac ggc tac gac ccg aag ttc	576
Asn Glu Gln Thr Ile Lys Ser Ala Leu Asn Gly Tyr Asp Pro Lys Phe	
180 185 190	
cac gtg gtg acc gag ccg gtc ggc cgc aac agc cgc ccg tac gac ggc	624
His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly	
195 200 205	
cgg ccc act tgt tgc ggg aac aac aac tgc atg ccg atc tgc ccg atc	672
Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile	
210 215 220	
ggc gcg atg tac aac ggc atc gtg cac gtc gag aag gcc gag cag gcc	720
Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Gln Ala	
225 230 235 240	
ggc gcg aag ctg atc gac agc ggc gtc gtc tac aag ctc gag acc ggc	768
Gly Ala Lys Leu Ile Asp Ser Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly	
245 250 255	
ccg gac aag cgc atc acc gcc ggc gtc tac aag gat aag acg ggt gcc	816
Pro Asp Lys Arg Ile Thr Ala Ala Val Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala	
260 265 270	
gac cat cgc gtc gaa ggc aag tac ttc gtg att gcc ggc aac ggt atc	864
Asp His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Ile Ala Ala Asn Gly Ile	
275 280 285	
gag acg ccg aag atc ctg ctg atg tcc ggc aac cgc gat ttc ccg aac	912
Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn	
290 295 300	
ggt gtc gcg aac agc tgc gac atg gtc ggc cgc aac ctg atg gac cac	960
Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His	
305 310 315 320	
ccg ggc acc ggc gtg tgc ttc tac ggc aac gag aag ctg tgg ccg ggc	1008
Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Asn Glu Lys Leu Trp Pro Gly	
325 330 335	
cgc ggc ccg cag gag atg acg tgc ctg atc ggc ttc cgc gac ggc ccg	1056
Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro	
340 345 350	
ttc cgc gcg acc gaa gcc gcg aag aag atc cac ctg tgc aac atg tgc	1104
Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Met Ser	
355 360 365	
cgc atc aac cag gag acg cag aag atc ttc aag gcc ggc aag ctg atg	1152
Arg Ile Asn Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met	
370 375 380	

aag ccc gag gag ctc gac gcg cag atc cgc gat cgt tcc gcg cgc tac 1200
 Lys Pro Glu Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr
 385 390 395 400
 gtg cag ttc gac tgt ttc cac gaa atc ctg ccg cag ccc gag aac cgc 1248
 Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg
 405 410 415
 atc gtg ccg agc aag acg gcc acc gac gcg atc ggc atc ccg cgc ccg 1296
 Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro
 420 425 430
 gag atc acc tat gcg atc gac gat tac gtg aag cgc ggc gcc gtg cac 1344
 Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Val His
 435 440 445
 acg cgc gag gtt tac gcg acg gcg gcg aag gtg ctg ggc ggt acc gaa 1392
 Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Glu
 450 455 460
 gtc gtc ttc aac gac gag ttc gcg ccg aac aac cac atc acg ggc gcg 1440
 Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ala
 465 470 475 480
 acg atc atg ggc gcg gat gca cgc gac tcg gtc gtc gac aag gac tgc 1488
 Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys
 485 490 495
 cgc acg ttc gac cat ccg aac ctg ttc atc tcg agc agc tcg acg atg 1536
 Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ser Thr Met
 500 505 510
 ccg acc gtc ggt acg gtg aac gtg acg ctg acg atc gcg gcg ctc gcg 1584
 Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala
 515 520 525
 ctg cgc atg tcg gac acg ctg aag aag gaa gtc tga 1620
 Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val
 530 535 540

【0059】

<210> 2

<211> 539

<212> PRT

<213> ABC

<400> 2

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
 20 25 30
 Ser Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
 35 40 45
 Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Val Asp Lys Thr Asp Phe Met Ala Pro
 50 55 60
 Tyr Pro Ser Ser Ala Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
 65 70 75 80
 Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
 85 90 95
 Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg

100	105	110
Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Thr Val Tyr Gly Val Gly Arg		
115	120	125
Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Ile Glu His Tyr Tyr Gln Arg Ala		
130	135	140
Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr		
145	150	155
Ser Pro Arg Lys Glu Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe		
165	170	175
Asn Glu Gln Thr Ile Lys Ser Ala Leu Asn Gly Tyr Asp Pro Lys Phe		
180	185	190
His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly		
195	200	205
Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile		
210	215	220
Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Gln Ala		
225	230	235
Gly Ala Lys Leu Ile Asp Ser Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly		
245	250	255
Pro Asp Lys Arg Ile Thr Ala Ala Val Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala		
260	265	270
Asp His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Ile Ala Ala Asn Gly Ile		
275	280	285
Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn		
290	295	300
Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His		
305	310	315
Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Asn Glu Lys Leu Trp Pro Gly		
325	330	335
Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro		
340	345	350
Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Met Ser		
355	360	365
Arg Ile Asn Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met		
370	375	380
Lys Pro Glu Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr		
385	390	395
Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg		
405	410	415
Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro		
420	425	430
Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Val His		
435	440	445
Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Glu		
450	455	460
Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ala		
465	470	475
Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys		
485	490	495
Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ser Thr Met		

500 505 510
 Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala
 515 520 525
 Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val
 530 535

【0060】

<210> 3
 <211> 1620
 <212> DNA
 <213> ABC
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1620)
 <400> 3
 atg gcc gat acc gat acg caa aag gcc gac gtc gtc gtc gtc gga tgc 48
 Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
 1 5 10 15
 ggt gtc gca ggc gcg atc gtt gca cac cag ctc gcg atg gcg ggc aag 96
 Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
 20 25 30
 tcc gtg atc ctg ctg gaa gcc ggc ccg cgc atg ccg cgc tgg gaa atc 144
 Ser Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
 35 40 45
 gtc gag cgc ttc cgc aac cag gtc gac aag acc gat ttc atg gcg ccg 192
 Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Val Asp Lys Thr Asp Phe Met Ala Pro
 50 55 60
 tac ccg tgc agc gcg tgg gcg ccg cat ccg gaa tac ggc ccg ccg aac 240
 Tyr Pro Ser Ser Ala Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
 65 70 75 80
 gac tac ctg atc ctg aag ggc gag cac aag ttc aac tgc cag tac atc 288
 Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
 85 90 95
 cgc gcg gtg ggc ggc acg acg tgg cac tgg gcc gca tgc gca tgg cgc 336
 Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
 100 105 110
 ttc atc ccg aac gac ttc aag atg aag acg gtg tac ggc gtc ggc cgc 384
 Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Thr Val Tyr Gly Val Gly Arg
 115 120 125
 gac tgg ccg atc cag tac gac gac atc gag cat tac tac ccg cgc gcc 432
 Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Ile Glu His Tyr Tyr Arg Arg Ala
 130 135 140
 gaa gag gaa ctc ggc gtg tgg ggc ccg ggc ccc gag gaa gac ctg tac 480
 Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
 145 150 155 160
 tgc ccg cgc aag gag ccg tac ccg atg ccg ccg ctg ccg ttg tgc ttc 528
 Ser Pro Arg Lys Glu Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
 165 170 175
 aac gag cag acg atc aag agc gcg ctc aac ggc tat gac ccg aag ttc 576
 Asn Glu Gln Thr Ile Lys Ser Ala Leu Asn Gly Tyr Asp Pro Lys Phe
 180 185 190

cac gtg gtg acc gag cct gtg gcg cgc aac agc cgc ccg tac gac ggc	624
His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly	
195 200 205	
cgg ccg act tgt tgc ggg aac aac aac tgc atg ccg atc tgc ccg atc	672
Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile	
210 215 220	
ggc gcg atg tac aac ggc atc gtg cac gtc gag aag gcc gac aag gcc	720
Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Asp Lys Ala	
225 230 235 240	
ggc gcg aag ctg atc gac agc gcg gtc gtc tac aag ctc gag acg ggc	768
Gly Ala Lys Leu Ile Asp Ser Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly	
245 250 255	
ccg gac aag cgc atc acc gcc gcg gtc tac aag gac aag acg ggc gcc	816
Pro Asp Lys Arg Ile Thr Ala Ala Val Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala	
260 265 270	
gac cac cgc gtc gaa ggc aag tac ttc gtg atc gcc gcg aac ggc atc	864
Asp His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Ile Ala Ala Asn Gly Ile	
275 280 285	
gag acg ccg aag atc ctg ctg atg tcc gcg aac cgc gat ttc ccg aac	912
Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn	
290 295 300	
ggt gtc gcg aac agc tgc gac atg gtc ggc cgc aac ctg atg gat cac	960
Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His	
305 310 315 320	
ccg ggc acc ggc gtg tgc ttc tac gcg aac gag aag ctg tgg ccg ggc	1008
Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Asn Glu Lys Leu Trp Pro Gly	
325 330 335	
cgc ggc ccg cag gag atg acg tgc ctg atc ggt ttc cgc gac ggc ccg	1056
Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro	
340 345 350	
ttc cgc gcg aac gaa gcc gcg aag aag atc cac ctg tgc aac atg tgc	1104
Phe Arg Ala Asn Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Met Ser	
355 360 365	
cgc atc aac cag gaa acg cag aag atc ttc agg ggc cgg cag ctg atg	1152
Arg Ile Asn Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Arg Gly Arg Gln Leu Met	
370 375 380	
aag ccc gag gag ctc gac gca cag atc cgc gac cgt tcc gcg cgc ttc	1200
Lys Pro Glu Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Phe	
385 390 395 400	
gtg cag ttc gac tgc ttc cac gaa atc ctg ccg caa ccc gag aac cgc	1248
Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg	
405 410 415	
atc gtg ccg agc aag acg gcc acc gac gcg gtc ggc atc ccg cgc ccc	1296
Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Val Gly Ile Pro Arg Pro	
420 425 430	
gag atc acg tat gcg atc gac gac tac gtg aag cgc ggc gcc gtg cac	1344
Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Val His	
435 440 445	
acg cgc gag gtc tac gcg acg gcc gcg aag gtg ctg ggc ggc acc gaa	1392
Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Glu	

450 455 460
 gtc gtc ttc aac gac gag ttc gcg ccg aac aac cac atc acg ggc gcg 1440
 Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ala
 465 470 475 480
 acg atc atg ggc gcg gat gca cgc gac tcg gtc gtc gac aag gac tgc 1488
 Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys
 485 490 495
 cgc acg ttc gac cat ccg aac ctg ttc atc tcg agc agc tcg acg atg 1536
 Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ser Thr Met
 500 505 510
 ccg acc gtc ggt acg gtg aac gtg acg ctg acg atc gcg gcg ctg gcg 1584
 Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala
 515 520 525
 ctg cgg atg tcg gac acg ctg aag aag gaa gtc tga 1620
 Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val
 530 535 540

【 0 0 6 1 】

<210> 4

<211> 539

<212> PRT

<213> ABC

<400> 4

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
 20 25 30
 Ser Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
 35 40 45
 Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Val Asp Lys Thr Asp Phe Met Ala Pro
 50 55 60
 Tyr Pro Ser Ser Ala Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
 65 70 75 80
 Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
 85 90 95
 Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
 100 105 110
 Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Thr Val Tyr Gly Val Gly Arg
 115 120 125
 Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Ile Glu His Tyr Tyr Arg Arg Ala
 130 135 140
 Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
 145 150 155 160
 Ser Pro Arg Lys Glu Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
 165 170 175
 Asn Glu Gln Thr Ile Lys Ser Ala Leu Asn Gly Tyr Asp Pro Lys Phe
 180 185 190
 His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly
 195 200 205
 Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile
 210 215 220

【0062】

【 0 0 6 3 】

【0064】	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence: primer	
【0065】	<400> 6	
	tcagacttcc ttcttcagcg	20
	<210> 7	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
【0065】	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence: primer	
	<400> 7	
	catgccatgg cacacaacga caacact	27
	<210> 8	
	<211> 28	
【0065】	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence: primer	
	<400> 8	
	cccaagcttc agacttcctt cttcagcg	28

 フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/04		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/68		5/00	A

Fターム (参考) 4B024 AA11 AA19 BA08 CA01 CA02
 GA11 HA12
 4B050 CC01 CC03 DD02 EE10 LL03
 LL10
 4B063 QA18 QQ05 QQ24 QQ42 QR32
 QR55 QS34 QX01
 4B065 AA01Y AB01 AC14 BA02
 CA28 CA46 CA60

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.